

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293361

研究課題名(和文) 悪性黒色腫における腫瘍免疫の破綻を解明する！～マウスリンパ浮腫モデルを用いて～

研究課題名(英文) Elucidating the collapse of immune system against malignant melanoma

研究代表者

山本 有平 (YAMAMOTO, YUHEI)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70271674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、我々が過去に報告したマウス後肢におけるin transit転移モデルを使用して、予後不良因子であるin transit転移の成立機構を解明することを目的とした。また、in transit転移モデルの基盤となるマウス後肢のリンパ浮腫モデルを改良し、安定的に浮腫が再現することを試みた。更にこのモデルを使用して、後肢浮腫モデルの分子生物学的解析を可能とした。リンパ管機能不全をきたした腫瘍微小環境における腫瘍免疫の破綻が、腫瘍の増殖や転移に影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish a consistent mouse hindlimb lymphedema model for further investigation of the mechanism and treatment of lymphedema. Using this modified mouse model, we analyzed lymphatic function, histological changes, and the expression of lymphangiogenic factors including vascular endothelial growth factor C at various time points. In addition, we reproduced melanoma in-transit metastasis in this model by implanting melanoma cells into the footpad of mice with lymphedema. Mice with in-transit metastasis were more likely to develop lung metastases than control mice. Primary tumor growth was augmented in lymphedema mice compared with control mice. These findings suggest that lymphatic dysfunction attenuates tumor immunity in malignant melanoma.

研究分野：皮膚悪性腫瘍、乳房再建、顔面神経麻痺

キーワード：組織培養・移植学 悪性黒色腫 リンパ浮腫 転移 リンパ管新生

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫の治療経過において、リンパ節郭清を施行した後に原発巣と所属リンパ節の間の皮膚領域に連続的または散在性にリンパ行性転移が生じる場合がある。この特殊な転移様式は in transit 転移といわれ、予後不良因子であるとされている。リンパ管機能不全をきたした腫瘍微小環境における腫瘍免疫の破綻が、in transit 転移の一因として考えられるが、詳細な機序は今のところ不明である。悪性黒色腫における in transit 転移の機序を解明することは、悪性黒色腫に特徴的な免疫逃避機構を標的とした治療につながる事が予想され、患者の予後の大幅な改善に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

我々は、過去の報告においてマウス後肢における in transit 転移モデルの開発に成功している(Oashi et al, J invest Dermatol, 2012)。このモデルを使用して、予後不良因子である in transit 転移の成立機構を解明することを本研究の目的とした。また、in transit 転移モデルの基盤となるマウス後肢のリンパ浮腫モデルを改良することで、安定的に浮腫が持続し、且つ再現性のあるモデルが可能となるようにした。更にこの後肢浮腫モデルを使用して、リンパ浮腫組織の分子生物学的解析が可能となるようにした。

3. 研究の方法

(1)マウス後肢リンパ浮腫モデルの作成

生後8週から10週のC57BL/6Nマウスを使用する。顕微鏡を使用してイソフルレンによる全身麻酔下で手術を行った。左足に後肢リンパ管を同定するためのパテントブルーを皮内注射した後、左鼠径部を全周性に切開する。左後肢全体にわたって染色されたリンパ管を中枢側と末梢側で10-0ナイロンで結紮処理する。その後、膝窩領域と腸骨下領域のリンパ節と周囲脂肪組織を切除して郭清する。最後に皮膚にある浅リンパ管からのリンパ流の流出を抑えるため、皮膚の創縁を筋肉に縫い付けて2mm程の皮膚のないgapをつける。以前の研究では、リンパ浮腫モデルを作成するにあたって、リンパ管の再生を抑制するため術前に鼠径領域に放射線照射を施行していた。本研究では、放射線照射によるマウスの全身免疫能の低下や骨髄壊死を防ぐため、放射線照射を術前に施行していない。放射線照射を事前に照射しない場合、浮腫の改善が早期にみられた。浮腫を一定期間、持続させるために鼠径領域にシリコンプリントを留置するモデルも作成した。以上で作成したリンパ浮腫モデルと、左鼠径を切開する手術侵襲を加えたのみのsham ope グループをコントロールとして比較する実験をおこなった。

(2)後肢浮腫評価

左踵から近位へ5mmの位置で後肢の周径を週毎に測定した。蛍光リンパ管造影であるlymphangiographyを行った。全身麻酔下でイ

ンドシアニンググリーン(ICG)を左足に皮下投与して近赤外線カメラであるPDEでリンパ流の評価を行った。

(3)病理組織学的検討

リンパ管を特異的に染色するLYVE-1で免疫染色を行い、浮腫組織におけるリンパ管の数と管腔の面積を測定した。また、HE染色により、浮腫組織の皮膚の厚さを測定した。

(4)リアルタイムRT-PCR

後肢の浮腫部位の皮膚・皮下組織を採取して液体窒素で瞬間凍結した。その後、ホモジナイズしてTotal RNAを抽出した。その後cDNAに逆転写した後、リアルタイムPCRを行った。使用したプライマーはVEGF-C、VEGFR-3、Prox1、VEGF-A、HPRT(内部標準)である。

(5)ウエスタンブロッティング法

後肢の浮腫部位の皮膚・皮下組織を採取して液体窒素で瞬間凍結した。その後、ホモジナイズした後、RIPAバッファーでタンパク質を抽出した。BCA法で定量した後、サンプルバッファーと混合して95℃で5分間ボイルした。SDS-PAGEで電気泳動して分離後、PVDF膜に転写した。希釈した1次抗体(VEGF-C、VEGFR-3、アクチン)を使用し4℃で一晩、抗原抗体反応を行った。その後、ペルオキシダーゼ標識2次抗体と室温で1時間抗体反応を行い、ケミルミネッセンスでバンドを検出した。

(6)悪性黒色腫細胞の培養

蛍光遺伝子であるルシフェラーゼを、悪性黒色腫細胞株のB16-F10に遺伝子導入して安定発現可能となったB16-F10-Luc2細胞を使用した。10%FBSを含むRPMI培地にて継代培養した。

(7)リンパ浮腫モデルへの移植

リンパ浮腫モデルと、コントロール群のマウスの左足に 4×10^5 個のB16-F10-Luc2悪性黒色腫細胞を移植した。

(8)in vivo イメージング

移植後3週間の間、生体内イメージング技術を用いて原発巣における腫瘍の増殖の程度と、転移様式を経時的に観察した。マウスの腹腔内に150mg/kgのルシフェリンを投与して10分後に、CCDカメラを有するIVIS systemの装置内に入れて、生物学的発光を検出した。

(9)ルシフェラーゼアッセイ

マウスにB16-F10-Luc2悪性黒色腫細胞を移植して3週間後に、両肺を採取した。両肺をCell Lysisバッファーで溶解して、遠心後、上清を採取した。ルシフェリンを添加して、ルミノメーターで生物学的発光を検出した。

(10)統計学的検定

2群間の比較はstudent t検定を行った。p値は0.05未満を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1)マウス後肢リンパ浮腫モデルの確立

手術翌日から左後肢の浮腫が発生し、最低1ヶ月間持続することが肉眼的に確認された。

蛍光リンパ管造影では、左後肢の膝窩につながるリンパ管は消失し、リンパ管から、皮膚へリンパ流が逆流する現象を反映する Dermal back flow を認めた。後肢の周径の評価では、1 週目に周径は最大となり、その後次第に浮腫は軽減したが、4 週目の時点においても浮腫は残存した。鼠径部にシリコンプリントを留置したリンパ浮腫モデルが、最も安定的に浮腫が持続することが確認できた。

ヒトの創傷治癒は肉芽増生と表皮化が主体であるのに対して、C57BL/6N マウスの創傷治癒機転は、収縮による創閉鎖が主体となる。そのため、ヒトと異なり、癒痕の少ない創傷治癒が進行しやすい。鼠径部にシリコンプリントを留置することで、収縮が抑えられ、肉芽増生と表皮化が進行し、鼠径部に線維化を伴う癒痕が形成されやすいことが確認された。結果として鼠径部に生じた癒痕は浮腫が持続する一因となると考えられた。LYVE1 による免疫組織学染色では、浮腫組織において拡張蛇行したリンパ管を多数認め、HE 染色では有意に皮膚の肥厚を認めた。

(2) リンパ管新生因子の発現検討

今回作成したリンパ浮腫モデルにおけるリンパ管新生因子の発現パターンを確認した。VEGF-C、VEGFR-3 は浮腫発生後 3 日目より発現が上昇してくることをウエスタンブロットで確認した。リアルタイム PCR においても VEGF-C、VEGFR-3 の mRNA の発現は 1 週間目で最大となり、しだいに減少してきた。後肢周径の推移を示したグラフと照らし合わせると、VEGF-C、VEGFR-3 の発現は浮腫の程度と相関することが示唆された。リンパ管新生における転写因子である Prox1 が mRNA レベルで発現が有意に亢進していることが確認された。血管新生に関わる VEGF-A は浮腫組織において有意な発現上昇を認めなかった。VEGF-C/VEGFR-3 のシグナル経路は癌のリンパ行性転移と密接に関与しているとされている。今回得られた知見は、リンパ浮腫組織において浮腫に反応性のリンパ管新生が惹起されていることを示すものであり、リンパ浮腫と癌転移経路の解明において重要な知見であると考えられる。

(3) in transit 転移モデルの解析

放射線照射を施行しないリンパ浮腫モデルにおいても in transit 転移が発生することが確認できた(図 1)。浮腫が長期間持続し、なおかつ蛍光リンパ管造影にてリンパ流の鬱滞が強いモデルにおいて、in transit 転移が発生しやすい傾向にあった(図 2)。これは、リンパ流鬱滞の程度や、浮腫の強さが悪性腫瘍の転移動態に影響を与えることを示唆する所見であった。経時的な生体内イメージングでは、in transit 転移が肉眼的に観察される前の段階で、発光が生じることが確認でき、微小転移の検出に有用であると考えられた。また、左足の原発巣の発光シグナルの増強は浮腫モデルで早期に(1 週間以内)検出された(図 3)。これは悪性黒色腫細胞が、リンパ管

機能不全の環境下において増殖能が高まることを示唆する所見であった。リンパ管機能不全は、その程度によって、腫瘍細胞に与える影響が段階的に変化する可能性があると考えられた。

ルシフェラーゼアッセイによる肺転移定量では、リンパ浮腫群において、有意に上昇していた。肺転移の程度も、リンパ浮腫部位のリンパ管機能不全の程度に相関する可能性があることが示唆されており、今後の研究を進めていく上で重要な知見が得られた。

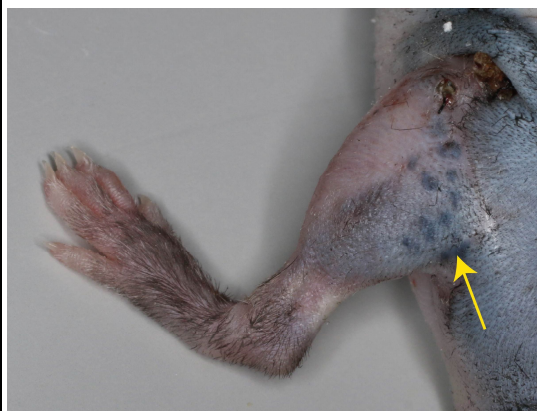


図 1: リンパ浮腫モデルにおける in transit 転移(黄矢印)



図 2: B16-F10-Luc2 悪性黒色腫細胞を移植して 3 週間後の所見。上図はリンパ浮腫モデル、下図は手術侵襲の無いコントロールマウス。

リンパ流の鬱滞が強いモデルにおいて、in transit 転移が発生しやすい。

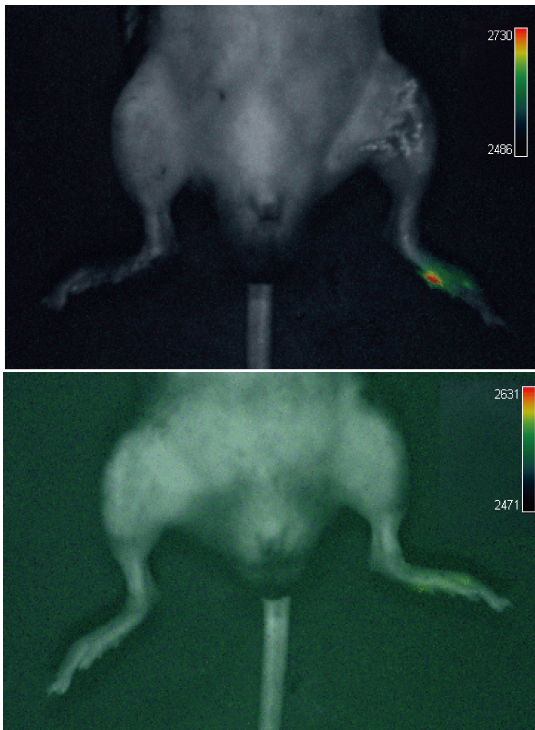


図 3: B16-F10-Luc2 細胞を移植して 1 週間後の *in vivo* イメージング。上図はリンパ浮腫モデル、下図は手術侵襲の無いコントロールマウス。リンパ浮腫モデルにおいては早期に腫瘍の増殖を示す発光シグナルの増強を認める。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 4 件)

岩寄大輔、村尾尚規、古川洋志、小山明彦、舟山恵美、山本有平: マウス後肢リンパ浮腫モデルにおけるリンパ管新生因子の発現に関する検討。第 24 回日本形成外科学会基礎学術集会, 岩手県盛岡市, 2015.10.9, 岩手県民会館

岩寄大輔、村尾尚規、古川洋志、小山明彦、舟山恵美、山本有平: マウスリンパ浮腫モデルにおけるリンパ管新生因子発現についての検討。第 7 回日本創傷外科学会総会・学術集会, 東京都文京区, 2015.7.25, 東京ドームホテル

岩寄大輔、村尾尚規、古川洋志、小山明彦、舟山恵美、山本有平: マウスリンパ浮腫モデルにおける HIF-1 α の発現の検討。第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会, 長野県松本市, 2014.10.9, キッセイ文化ホール

村尾尚規、大芦孝平、古川洋志、塩谷隆太、山本有平: 悪性黒色腫 *in transit* 転移にお

ける腫瘍免疫～マウスリンパ浮腫モデルを用いた解析の試み。第 22 回日本形成外科学会基礎学術集会, 新潟県新潟市, 2013.11.8, 新潟コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 有平 (YAMAMOTO YUHEI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 70271674

(2) 研究分担者

古川 洋志 (FURUKAWA HIROSHI)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 00399924

小山 明彦 (OYAMA AKIHIKO)
北海道大学・大学病院・講師
研究者番号: 70374486

林 利彦 (HAYASHI TOSHIHIKO)
北海道大学・歯学研究科・准教授
研究者番号: 00432146

舟山 恵美 (FUNAYAMA EMI)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 10533630

村尾 尚規 (MURAO NAOKI)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号: 90706558

(3) 連携研究者

清野 研一郎 (SEINO KENICHIRO)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授
研究者番号: 20312845